從結構生物學探討疏經活血湯對抗凝血劑之中西藥交互作用

Investigation of Interaction between Shu-Gin-Hwai-Shen-tang and Anticoagulant Warfarin from the Perspective of Structural Biology

前言

- 疏經活血湯源自《萬病回春》卷五，由當歸、生地黃、蒼朮、川芎、桃仁、茯苓、白芍、牛膝、防風、威靈仙、龍膽草、生薑、陳皮、白芷、甘草、防己、羌活等17味藥材組成，其主要功用為「疏經、活血、祛濕」。
- 在2014 年研究中醫臨床處方使用，發現健保中醫門診疏經活血湯為前十大常用的複方之一。

前 言

- 疏經活血湯除了傳統主治遍身走痛如刺，左足痛尤甚者，以及《萬氏家抄方》卷上所提及治臂癰；現今醫學用意用於風濕性關節炎、類風濕性關節炎、強直性脊椎炎、坐骨神經痛等治療，亦治療痛風，漿液性關節炎，腰痛，坐骨神經痛，腳氣，浮腫，紫斑病，產後血栓性疼痛等病症之使用。
- 在1995年中國中醫藥報刊出，疏經活血湯對於放射性治療時對患部周圍皮膚的照射所引起脫毛、乾燥、紅斑、潰瘍等損害副作用亦都有明顯治療效果；日本醫學也以動物實驗映證其功效，也更加活用「疏經、活血、祛濕」的適應症範圍。

前 言

- 多元的醫療發展普遍，民眾為已服用疏經活血湯又同時併用溶血栓、止痛、非固醇類消炎藥等情形。中醫師的臨床經驗，單以疏經活血湯使用並不影響凝血酶原活性指數，但病人同時併用warfarin 偶有胃出血發生；
- 用紐西蘭兔凝血實驗顯示疏經活血湯與warfarin 併用時亦產生中西藥物交互作用，影響warfarin 凝血時間的參數[1]。

1. Yang SH, Yu CL, Chen HY, Lin YH. A commonly used Chinese herbal formula, Shu-Jing-Hwo-Shiee-Tang, potentiates anticoagulant activity of warfarin in a rabbit model. Molecules. 2013; 5;18(10):11712-23

前 言

- 藥物代謝主要是由肝細胞之細胞色素群P450s 進行氧化代謝。細胞色素群P450s，是一群含鐵元蛋白質家族組成，CYP2C9 是重要藥物代謝酵素，廣泛受質偏好和受質差異調控[2,3]，亦成為藥廠評估藥物交互作用之分析方法。
- 疏經活血湯在臨床併用西藥之溶血栓、止痛、非固醇類消炎藥等，例如常見包含warfarin[4]、tolbutamide[4]、 diclofenac[4]、 phenytoin[5] 和 flurbiprofen[6,7]等，皆為CYP2C9 的代謝受質。

前 言

- 疏經活血湯的生物活性指標成分(fangchinoline、genistein、hesperetin、paeoniflorin 和tetrandrine)已分析鑑定以疏經活血湯指標代表，再以CYP2C9 的結構為元件模式酵素[6-9]，以西藥為受質成分搭配疏經活血湯指標成分為競爭或抑制劑，用分子結構對接模型一窺中西藥物交互作用影響CYP2C9 對受質作用活性機制。

前 言

- 首先，利用酵素動力學、計算結構生物學[10]，闡明受質與酵素間作用機制對中西藥交互作用研究創新思維，可協助說明天然物對CYP2C9受質代謝作用影響的機制探討，闡明其作用機制，藉此釐清疏經活血湯成分對不同CYP2C9西藥受質之抑制作用及其分子結構機制。
- 此研究利用計算結構生物學角度探討中藥疏經活血湯對西藥抗凝血劑Warfarin 之中西藥交互作用。

材料與方法

一、 結構生物學分子對接和分析工具軟體:

（一） 分子對接軟體：GOLD

（二） 結構生物學分析工具：Discovery Studio

（三） 繪製2D 化合物結構軟體：ChemDraw

（四） 蛋白質結構呈現軟體：PyMol 和 Ligplot

材料與方法

二、 準備蛋白質結構：

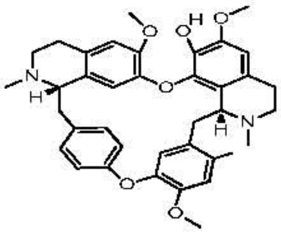
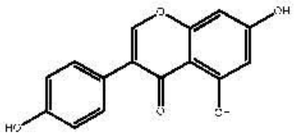
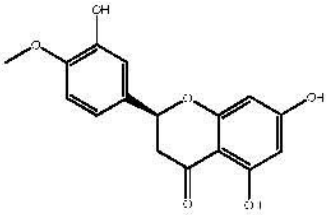
為了將蛋白質三維結構最佳化，首先利用Discovery Studio 的巨分子模組在蛋白質結構上進行分析，使軟體辨識各種不同的胺基酸。接著再去除水分子、加氫及電荷，需注意的是在活化位中需要保留鐵原子(HEME)，否則會影響分子對接的準確性。

材料與方法

三、 準備配體分子結構：

使用ChemDraw描繪出表1和表2化合物的分子結構式，先另存為2D結構，再以DiscoveryStudio 將配體分子加氫及電荷，並考慮環的結構、能量最小化等條件，最後以3D的方式呈現分子結構，並進行分子對接。

表1. 疏經活血湯其5 個主要的生物活性指標成分、結構、分子量等特性：

編號	化合物名稱	化學結構	天然中草藥來源	分子量	XLogP3
1	Fangchinoline 防己諾林鹼		防己科千金藤屬植物：粉防己、防己、膜莢黃耆。	608.72	6.1
2	Genistein 金雀異黃酮		葛根、山豆根、紅車軸草、黃羽扇豆、黃花木、黑大豆、槐角、杜仲、龍船花、攀援魚藤、染料木、肉蓯蓉、水線草、梔子、非洲樹紫藤、廣布丁公藤、極寬刺桐、大豆、柰園留草、毒灰毛豆、陳皮。	270.23	2.7
3	Hesperetin 橙皮素 (橙皮苷配基)		芸香科柑桔屬植物、甜橙、檸檬等，陳皮。	302.27	2.4

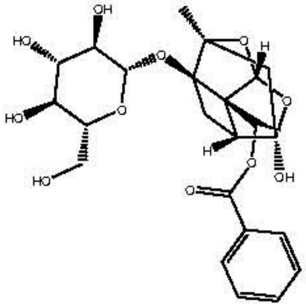
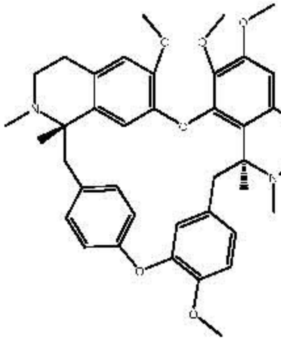
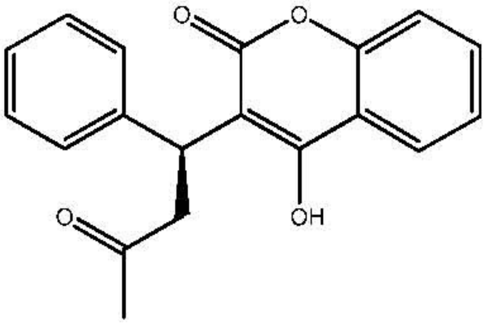
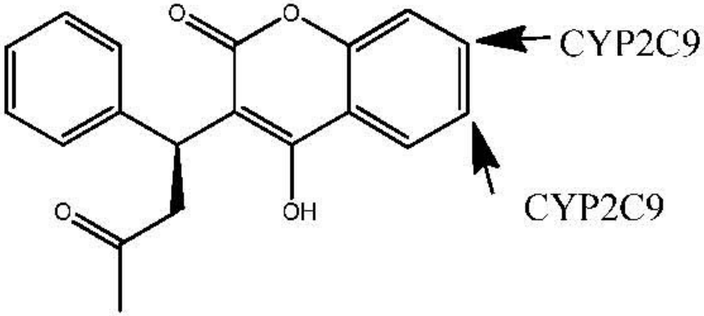
4	Paeoniflorin 芍藥苷		毛茛科植物芍药：白芍、赤勺。	480.46	-1
5	Tetrandrine 粉防己		防己科植物粉防己：膜荚黄耆、白藥子、防己、青木香、漢防己、錫生藤、蝙蝠葛根、彩紋千金藤、銀不換。	622.74	6.4

表 2. 西藥受質 S-warfarin 結構和藥理機制：

<table>
<tr><th>編號</th><th>西藥小分子</th><th>2D 結構</th><th>藥理機制</th><th>分子量</th><th>XLogP3</th></tr>
<tr><td rowspan="3">1</td><td rowspan="3">S-warfarin
(SWF)</td><td></td><td>廣泛用於預防深部靜脈栓塞、心房纖維顫動或機械瓣膜置換所引起之栓塞。</td><td>308.32</td><td>2.7</td></tr>
<tr><td colspan="4">受 CYP2C9 羥化修飾機制</td></tr>
<tr><td colspan="4">
</td></tr>
</table>

四、 結構生物學分子對接(Docking)

– GOLD，全名為 Genetic Optimisation for Ligand Docking，主要是利用基因演算法(Genetic Algorithm) 對配體進入蛋白質的結合部位的分子對接軟體。可針對部分蛋白質進行柔性對接(Flexible docking)，並且有包含蛋白質支鏈和主鏈的柔性。

四、 結構生物學分子對接(Docking)

- CYP2C9 的蛋白質X-ray結構晶體的序號為1OG5[11]，從晶體結構觀察，將此分子對接於CYP2C9 蛋白的結合部位分成兩個，分別為活性區(active site; 比較靠近鐵原子部位) 和異位調節區(allosteric site) 。

四、 結構生物學分子對接(Docking)

- 配體分別使用西藥受質s-warfarin (SWF) 和疏經活血湯生物活性指標成分(fangchinoline、genistein、hesperetin、paeoniflorin和tetrandrine)，分子對接評分方式採用Goldscore、Chemscore。Fitness score 值越高，代表分子對接的結果越好。而 Fitness score 在運算時，會針對配體在活化區域的分子姿勢做最佳化。

結 果

一、CYP2C9蛋白質序列分析：

表 3. 從 NCBI 擷取 CYP2C9 蛋白質序列如下

MDSLVVLVLC	LSCLLLLSLW	RQSSGRGKLP	PGPTPLPVIG	NILQIGIKDI	SKSLTNLSKV
YGPVFTLYFG	LKPIVVLHGY	EAVKEALIDL	GEEFSGRGIF	PLAERANRGF	GIVFSNGKKW
KEIRRFSLMT	LRNFGMGKRS	IEDRVQEEAR	CLVEELRKTK	ASPCDPTFIL	GCAPCNVICS
IIFHKRFDYK	DQQFLNLMEK	LNENIKILSS	PWIQICNNFS	PIIDYFPGTH	NKLLKNVAFM
KSYILEKVKE	HQESMDMNNP	QDFIDCFLMK	MEKEKHNQPS	EFTIESLENT	AVDLFGAGTE
TTSTTLRYAL	LLLLKHPEVT	AKVQEEIERV	IGRNRSPCMQ	DRSHMPYTDA	VVHEVQRYID
LLPTSLPHAV	TCDIKFRNYL	IPKGTTILIS	LTSVLHDNKE	FPNPEMFDPH	HFLDEGGNFK
KSKYFMPFSA	GKRICVGEAL	AGMELFLFLT	SILQNFNLKS	LVDPKNLDTT	PVVNGFASVP
PFYQLCFIPV					

二、利用結構生物學之分子對接探討S-warfarin (SWF)多重受質結合複合體：

SWF已結合在異位異味調節區(allosteric site)，稱西藥受質稱為SWF-1，西藥受質S-warfarin (SWF)和CYP2C9形成的過渡態複合體結構(complex structure of transition state)，稱西藥受質為SWF-2。

三、探討CYP2C9 對S-warfarin (SWF-1)和Hesperetin 交互作用力

從分子對接模型中，計算實驗結果顯示在疏經活血湯中的Hesperetin 比其它四個生物活性指標成分fangchinoline、genistein、paeoniflorin 和tetrandrine 結合於活性區更強。

結論

- 從SWF-1、SWF-2 和CYP2C9 分子對接複合體結構模型得知SWF-1 和SWF-2 彼此間的重要作用力為氫鍵，此作用力為驅動力(driving force)使得藥物和藥物之間的交互作用得以產生。
- 同樣地，當SWF-1 佔據了異位調節區時，在疏經活血湯指標成分(fangchinoline、genistein、hesperetin、paeoniflorin 和tetrandrine)只有hesperetin 存在於活性區與SWF-1彼此之間產生了氫鍵，促使中藥小分子和西藥小分子產生的交互作用。

結論

- 由此可知當藥物和藥物要產生交互作用，氫鍵是不可或缺的驅動力。若要產生中西藥交互作用，中藥小分子作用於活性區的評分需要優於SWF-2 的分數，而此小分子就有機會競爭掉原本SWF-2的活性區的位置，使得中草藥小分子抑制了CYP2C9 的活性，進而干擾CYP2C9代謝SWF-2。

結論

- 本研究未來希望可以建立CYP450 家族所有蛋白質結構模型的建立，藉以了解哪些CYP450 蛋白會跟哪些中藥小分子有影響，利用結構生物學的分子模擬闡述實驗生物活性之中西藥所有交互作用，藉此釐清中西藥受質之抑制作用及其分子結構機制，此資訊除了協助中西藥受質的藥物交互作用建立重要的建立評估交互作用之基礎，確保醫療效果與防止藥物傷害。藉此方式傳遞正確中藥和西藥交互作用的訊息。

結論

- 雖然在體外實驗的CYP2C9 活性測試是用來評估藥物代謝和藥物-藥物之間的交互作用的好方法，但我們仍然不知道中藥是如何作用於西藥藥物導致CYP 酵素可能影響各種藥物的代謝和清除。

參考文獻

1. Yang SH, Yu CL, Chen HY, Lin YH. A commonly used Chinese herbal formula, Shu-Jing-Hwo-Shiee-Tang, potentiates anticoagulant activity of warfarin in a rabbit model. Molecules. 2013; 5;18(10):11712-23.
2. Kumar, V., Rock, D. A., Warren, C. J., Tracy, T. S., and Wahlstrom, J. L. Enzyme source effects on CYP2C9 kinetics and inhibition, Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 2006, 34, 1903-1908.
3. Kumar, V., Wahlstrom, J. L., Rock, D. A., Warren, C. J., Gorman, L. A., and Tracy, T. S. CYP2C9 inhibition: impact of probe selection and pharmacogenetics on in vitroinhibition profiles, Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2006; 34, 1966-1975.
4. Zhou SF, Zhou ZW, Yang LP, Cai JP. Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development. Curr Med Chem. 2009;16(27):3480-675.

參考文獻

5. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Altman RB, Klein TE. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. Clin Pharmacol Ther. 2012 ;92(4):414-7.

6. Yamazaki H, Inoue K, Chiba K, Ozawa N, Kawai T, Suzuki Y, Goldstein JA, Guengerich FP, Shimada T. Comparative studies on the catalytic roles of cytochrome P450 2C9 and its Cys- and Leu-variants in the oxidation of warfarin, flurbiprofen, and diclofenac by human liver microsomes. Biochem Pharmacol. 1998; 15;56(2):243-51.

7. Wester, M. R., Yano, J. K., Schoch, G. A., Yang, C., Griffin, K. J., Stout, C. D., and Johnson, E. F. The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-A resolution, The Journal of biological chemistry. 2004; 279, 35630-35637.

8. Branden, G., Sjogren, T., Schnecke, V., and Xue, Y. (2014) Structure-based ligand design to overcome CYP inhibition in drug discovery projects, Drug discovery today. 2014; 19, 905-911.

參考文獻

9. Hung, T. C., Kuo, C. C., and Chen, C. Y. In Silico Investigation of Cytochrome P450 2C9 in relation to Aging Using Traditional Chinese Medicine, Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2014, 404505.

10. Mendieta-Wejebe, J. E., Correa-Basurto, J., Garcia-Segovia, E. M., Ceballos-Cancino, G., and Rosales-Hernandez, M. C. Molecular Modeling Used to Evaluate CYP2C9-Dependent Metabolism: Homology Modeling, Molecular Dynamics and Docking Simulations, Current drug metabolism. 2011 ;12(6):533-48. Review

11. Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Matak Vinkovic, D., and Jhoti, H. (2003) Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin, Nature. 2003; 424, 464-468.

12. 林立偉、翁芸芳、蔡耿彰、許鴻儒、施純全、陳旺全。從結構生物學探討疏經活血湯對抗凝血劑之中西藥交互作用。臺灣中醫醫學雜誌。2015。13:1-11。